

Brain serotonin throughout development-for better and for worse

Citation for published version (APA):

Weidner, M. T. (2018). *Brain serotonin throughout development-for better and for worse*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20180620mw>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180620mw](https://doi.org/10.26481/dis.20180620mw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Appendix

Summary

The work presented in this thesis covers the effects of early-life adversity in the context of altered serotonin (5-HT; 5-hydroxytryptamine) system functioning in mice. The main body is focussing on a screening approach identifying molecular processes, potentially involved in distinct behavioural manifestations that emerge from or are concomitant with early adversity and, with regard to some behavioural manifestations, dependent on the functioning of the 5-HT system.

Chapter 1 gives a short conceptual introduction into gene-by-environment interactions, with a focus on early adversity and genetic variants of the 5-HT system. Furthermore, it introduces epigenetic modifications at the DNA strand itself as well as at histone tails as potential link between genetic variation and experiences throughout life. This introduction is followed by a brief outline of this thesis.

In **chapter 2**, we give an overview on the physiological and molecular footing of aggressive behaviour. Moreover, the chapter discusses the aetiology of violent manifestations and points out the vast heterogeneity of identified correlates, making the search for a unitary cause pointless. One line of work, found that molecular changes, induced and affected by early-life adversity, promote aggression-related pathology and that many of the observed changes were related to changes in the 5-HT system. The 5-HT system is suggested to serve as a distinctive regulator of aggressive behaviour related to exaggerated, sociopathy-like aggression. Furthermore, we point out that the stress-induced alterations in 5-HT system functioning are most likely brought about by and also causally involved in inducing epigenetic modifications. Finally, the importance of more integrative working models is emphasised, suggesting future work to focus more on unravelling gene accessibility and consequent transcriptional activity by examining chromatin as regulatory machinery that integrates multiple layers of environmental input over time.

Chapters 3 and 4 report findings of behavioural and molecular screening studies, following gene-by-environment interactions involving diverse components of the 5-HT system in the context of adversity during relevant developmental periods. In **chapter 3**, consequences of the reciprocal relationship of 5-HT and early adversity were investigated using a tryptophan hydroxylase 2 (*Tph2*)-deficient mouse line (*Tph2* x MS). *Tph2* null mutant (*Tph2*^{-/-}) and heterozygous (*Tph2*^{+/-}) mice, resulting in full or partial depletion of brain 5-HT, respectively, as well as their wildtype littermates were exposed to neonatal maternal separation (MS). Subsequently, adult, male offspring were screened for behavioural, physiological and molecular changes. The focus of the behavioural screening was on behaviours of emotional dysregulation, such as anxiety and aggression. In this study we found that the full 5-HT depletion in *Tph2*^{-/-} mice profoundly affected most of the investigated behaviours, body-weight and the presence of faecal corticosterone metabolites under home cage conditions. *Tph2*^{-/-} mice showed increased locomotor activity, decreased anxiety in an aversive context, decreased social behaviour and a more pronounced stress response to behavioural testing. Wildtype offspring, showed a behavioural profile profoundly distinct from that observed in TPH2-deficient mice. This difference was

found to be washed out following MS, in particular, with regard to aggression-related behaviour and activity. Interestingly, *Tph2*^{+/-} offspring showed an ambiguous profile, either intermediate or comparable to wildtype or *Tph2*^{-/-} mice, dependent on the investigated task. On the molecular level *Tph2* genotype and its interaction with MS were associated with distinct changes in RNA expression. A subset of differentially expressed genes (3%) showed an overlap with the specific DNA methylation profiles at corresponding loci. A promising candidate arising from this analysis was the hormone cholecystokinin, which can also act as neuropeptide and was furthermore associated with the observed anxiety behaviour in the current study.

In **chapter 4**, we were focussing on differential susceptibility to early adversity. This was investigated in the context of a 5-HT transporter (*5-Htt*) genetic variant. Resilience is the key towards mental well-being and a wealth of research suggested that 5-HT system-dependent mechanisms might be involved. In humans, the *5-HTT* gene-linked polymorphic region (*5-HTTLPR*), in particular, proved to be of relevance in modifying the outcome of early adversity. Therefore, we chose to use offspring of a *5-Htt*-deficient mouse line, in order to investigate the effects of prenatal stress, with a focus on differential susceptibility and associated molecular changes. A behavioural screening in these mice, with focus on anxiety-related and depressive-like behaviours, revealed that, dependent on the *5-Htt* genotype, offspring of PS dams showed distinct reactivity to the elevated plus maze and the 3-chamber sociability test. Furthermore, differential susceptibility to PS was associated with differential gene expression in the hippocampus. Similar to the behavioural observations, the distinct expression profile was found to be dependent on the *5-Htt* genotype, with up to 30 times more genes regulated in *5-Htt*^{+/-} offspring when compared to *5-Htt*^{+/+} offspring. These observed molecular changes were in particular related to genes, involved in oligodendrocyte differentiation and myelination. Besides the gene expression profile, we determined genome-wide H3K4me3 profiles. As for the RNA expression, the observed changes were distinctive for genotype and susceptibility, but showed only marginal overlap with the determined, differentially expressed genes.

In **chapters 5 and 6**, a more targeted approach was employed. To further investigate the morpho-functional consequences of early adversity, we employed an c-Fos immunohistological staining in **chapter 5**. This study was aimed at further elucidating the suggested interaction of 5-HT and MS with regard to the effects on anxiety-related behaviours. As described for **chapter 3**, we used *Tph2*^{-/-}, *Tph2*^{+/-} and wildtype offspring, exposed or not exposed to neonatal maternal separation and performed anxiety-related tests followed by neural activity imaging during adulthood. Interestingly, MS effects were only found in *Tph2*-deficient animals. In both anxiety tests MS promoted a more active approach in brain 5-HT-deficient offspring. On the neural level, we observed an activation in most of the investigated regions of the fear circuitries. However, some of these regions also showed a distinctive activation pattern, dependent on the test, *Tph2* genotype and/or MS, suggesting the involvement of specific circuitries and susceptibility to the different tasks and predispositions.

In **chapter 6**, we aimed to validate a candidate gene, i.e. myelin basic protein (*Mbp*), which we previously linked to PS. The effects of PS on the expression and methylation of *Mbp* were furthermore found to be dependent on the genetic variation of *5-Htt*. In the current study, we investigated the DNA methylation profile in both, human infants and adult mice, in the context of maternal experiences and

emotions during pregnancy. In mice, we furthermore determined the expression of two distinct forms of *Mbp*. In humans, early adversity was examined by use of stress- and anxiety-related questionnaires and cortisol measures. Methylation at the *MBP* locus was investigated in umbilical cord blood of the offspring. Pregnant mice were exposed to restraint stress and offspring, either heterozygous for a *5-Htt* gene variant, or wildtype, were analysed with regard to *Mbp* mRNA expression, *Mbp* methylation and myelin-related, histological parameters in the hippocampus. Interestingly, the investigation of *MBP* methylation in both species seemed to be susceptible to early programming, irrespective of the tissue investigated. In human infants, an increase of the maternal cortisol was positively related to *MBP* gene methylation at one of two investigated CpG sites. In mice, PS-induced, reduced weight gain during the stress period was associated with an increased methylation at a previously identified CpG site at the *Mbp* gene in wildtype but not in *5-Htt*-deficient offspring. As for the histological approaches, only a genotype dependent effect was observed, suggesting that the observed altered level in DNA methylation might represent DNA priming and only take effect in the context of further challenge.

Finally, in **chapter 7** the experimental results, presented in this thesis are critically discussed and put into perspective. Limitations of the conducted studies and potential future directions are highlighted. Overall the results of our studies emphasize the critical role 5-HT plays in the modulation of early adversity. The results await further research dissecting the identified candidate genes and pathways.

Zusammenfassung

Diese Arbeit berichtet Ergebnisse der umfassenden Erforschung des Einflusses von aversiven Bedingungen während der pränatalen und frühkindlichen Entwicklungsphase, unter dem Einfluss genetischer Variationen des serotonergen (5-HT, 5-Hydroxytryptamin) Systems, im Mausmodell. Der Hauptfokus der Thesis lag bei der hypothesenfreien Untersuchung der Konsequenzen, die durch den kombinierten Effekt aversiver Bedingungen, und genetischer Prädisposition ausgelöst werden, sowie, final, der Ermittlung potentieller Kandidatengene, die an der Manifestierung verhaltensbezogener Konsequenzen beteiligt sein können sowie durch epigenetische Mechanismen reguliert werden.

Kapitel 1 führt kurz in den konzeptionellen Entwurf von Gene-Umwelt-Interaktionen ein, mit einem Fokus auf die pränatale und frühkindliche Periode und 5-HT relevante genetische Prädispositionen. Des Weiteren werden epigenetische Modifizierungen am DNS-strang selbst oder an den Enden der Histonstränge als mögliche Brücke zwischen Umwelt und Genom vorgestellt. Kapitel 1 wird abgeschlossen durch eine Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit.

In **Kapitel 2** wird zunächst die physiologische und molekulare Basis aggressiven Verhaltens zusammengefasst, gefolgt von einer Diskussion möglicher Auslöser übersteigter Aggression. Zudem wird das komplexe Wesen identifizierter Auslöser dargestellt. Die Mannigfaltigkeit potentiell kausaler Kandidatengene und Mechanismen ist überwältigend und verhindert die Determinierung einzelner, kausaler Komponenten. Eine potentielle Forschungsrichtung, die sich mit abnormer Aggressivität befasst, erforscht die molekularen Veränderungen, die durch das Erfahren pränataler oder frühkindlicher, negativer Erlebnisse ausgelöst werden. Diese Veränderungen scheinen Aggressivität zu fördern und sind, unter Anderem, mit Veränderungen im 5-HT-system assoziiert. Auch, wurde das 5-HT-system als einer der regulatorischen Faktoren identifiziert, die übersteigerte Aggression und den zweckorientierten Gebrauch von Aggression, wie er bei Psychopathie beobachtet wird, spezifisch unterscheidet. Des Weiteren wird in dieser Review diskutiert, dass die beobachteten Änderungen im 5-HT-system sowohl kausal für, als auch Konsequenz von epigenetischen Modifizierungen sind. Extensive Forschung an Gen-Umwelt-Interaktions Modellen unterstreicht die Vielschichtigkeit epigenetischer Regulation, die sich in den komplexen Gen-Umwelt- und Gen-Gen-Umwelt-Interaktionen, sowie den kumulativen Effekten verschiedener Umweltaspekte widerspiegelt. Zukünftige Forschung muss daher einen ganzheitlichen Ansatz anstreben, der Chromatin als regulatorische Interaktionsfläche begreift, die Erfahrungen in Regulation umwandelt und so die epigenetische Landschaft eines Individuums definiert.

In **Kapitel 3** und **4** werden die Ergebnisse zweier hypothesenfreier Untersuchungen beschrieben, die sich jeweils auf einen anderen Aspekt des 5-HT-systems, sowie andere Entwicklungszeitpunkte bezogen. In **Kapitel 3** wurde der Zusammenhang frühkindlicher Deprivation mit dem physiologischen Mangel an 5-HT im Gehirn erforscht. Zu diesem Zweck wurden Mäuse, die eine genetische Ablation des Gens für Tryptophan-Hydroxylase 2 (*Tph2*) haben, und somit kein 5-HT im Gehirn synthetisieren können, einem Paradigma frühkindlichen Entzugs der mütterlichen Fürsorge ausgesetzt. Homozygot defiziente Welpen (*Tph2*^{-/-}), heterozygot defiziente Welpen (*Tph2*^{+/-}), sowie deren wildtypische Geschwister, wurden während der ersten zwei Lebenswochen für mehrere Stunden am Tag von der Mutter getrennt. Im Erwachsenenalter wurden diese Tiere dann auf Verhaltensauffälligkeiten und

physiologische sowie molekulare Effekte untersucht. Die untersuchten Verhalten waren vor Allem auf Verhalten emotionaler Dysfunktion, wie zum Beispiel Angstverhalten und Aggression, begrenzt. In dieser Studie beobachteten wir, dass ein vollständiger Mangel an 5-HT im Gehirn schwerwiegende Konsequenzen auf die beobachteten Verhalten, das Körpergewicht der Tiere, sowie deren Corticosteron-metabolit Spiegel in Faeces hat. Die beobachteten Effekte waren unabhängig von der frühkindlichen Stresserfahrung. *Tph2^{-/-}* Tiere waren aktiver, weniger angstinhibiert und weniger sozial als ihre wildtypischen Geschwister. Auch, zeigten die vollständig 5-HT defizienten Tiere einen deutlich erhöhten Corticosteron-metabolit Spiegel unter basalen Bedingungen. Das beobachtete Verhalten in wildtypischen Geschwistern schien sich jedoch nach der frühkindlichen Separation von der Mutter an das, in 5-HT defizienten Tieren beobachtete, Verhaltensprofil anzugleichen. Heterozygote Nachkommen zeigten ein sehr zwiespältiges Profil, welches einmal dem Profil in *Tph2^{-/-}* Tieren und einmal dem Verhalten, welches in wildtypischen Tieren beobachtet wurde, glich. Zudem wurden auch intermediäre Level in *Tph2^{+/-}* Tieren beobachtet. Auf der molekularen Ebene hatten, sowohl *Tph2* Defizienz, als auch die Interaktion zwischen *Tph2* Defizienz und frühkindlichem Stress, spezifische Auswirkungen. Ein Anteil an Genen, deren Expression durch den Genotyp, oder dessen Interaktion mit Stress beeinflusst war, war auch mit einem differentiell methylierten *Locus* assoziiert. Etwa 3% aller differentiell exprimierten Gene zeigten eine solche Überlappung und besonders eines dieser Gene schien vielversprechend als potentieller Effektor frühkindlicher Deprivation und 5-HT Defizienz, da es nicht nur durch die gleichen Faktoren in Expression und Methylierung beeinflusst wurde, sondern zudem, sowohl Genexpression, DNS Methylierung als auch Angstverhalten miteinander korreliert waren. Das *Cck* Gen kodiert das Neuropeptid Cholecystokinin. Cholecystokinin ist ein Hormon des Gastro-Intestinal-Trakts und erfüllt auch eine Rolle als Neuropeptid im Gehirn, wo es mit Angstverhalten assoziiert ist.

In **Kapitel 4** konzentrierten wir uns auf differentielle Suszeptibilität zu pränatalem Stress im Kontext einer genetischen Variante des 5-HT Transporters (5-Htt, Sert, Slc6a4). Verringerte Suszeptibilität, die auch als Resilienz bezeichnet wird, ist der Schlüssel zu psychischer Gesundheit. Viele Studien, die sich die Erforschung von Resilienz zum Ziel gesetzt hatten, fanden Grund zu der Annahme, dass das 5-HT-system dabei eine Rolle spiele. Der 5-HTT Längenpolymorphismus (5-HTTLPR) wurde dabei zu einem Subjekt besonderen Interesses in Studien, die solche Suszeptibilität in Menschen untersuchten. In unserer Studie verwendeten wir daher Tiere einer *5-Htt* defizienten Mauslinie und untersuchten die Nachkommen wildtypischer Mütter, die von einem heterozygoten Männchen geschwängert worden und vom Tag 13 bis zum Tag 17 der Schwangerschaft einem Stressparadigma ausgesetzt worden waren, im erwachsenen Alter. Die erwachsenen Nachkommen wurden in Bezug auf Verhalten, sowie physiologische und molekulare Effekte untersucht. Die Verhaltenstests zeigten, dass abhängig vom *5-Htt* Genotypen, unterschiedliche Verhaltensprofile beobachtet werden konnten. Am auffälligsten war die hohe Varianz in pränatal gestressten Tieren in zwei Angsttests, der eine mit Fokus auf aversive Stimuli, der andere mit Blick auf soziale Interaktion. Das aufteilen der Tiere in Suszeptibilitätsgruppen zeigte im Folgenden, dass in wildtypischen Nachkommen pränataler Stress zur Verringerung sozialen Verhaltens führte, dass jedoch in den selben Tieren, in denen eine Verringerung des Sozialverhaltens beobachtet wurde, auch eine Verringerung des Angstverhaltens in einer aversiven Umgebung beobachtet werden konnte. In *5-Htt* defizienten Tieren war dieses Verhältnis umgekehrt und die sozial normalen, gestressten Nachkommen zeigten auch ein verringertes Angstverhalten in der aversiven

Umgebung. Diese differentielle Suszeptibilität war zudem mit einem spezifischen Genexpressionsprofil im Hippocampus assoziiert. In *5-Htt* defizienten Nachkommen waren 30-mal mehr Gene reguliert in ihrer Expression als in ihren wildtypischen Geschwistern und auch waren viele der geänderten Gene assoziiert mit der Differenzierung von Oligodendrozyten, sowie der Myelinisierung *per se*. Die zusätzlich durchgeführte Analyse der immunbasierten Anreicherung der Histon-modifikation H3K4me3 zeigte zwar spezifische Profile für die genotyp-spezifische, differenzielle Suszeptibilität, aber nur geringe Überlappungen mit dem Genexpressionsprofil.

In **Kapitel 5** und **6** wendeten wir zielgerichtete Methoden an um die morpho-funktionellen Konsequenzen pränatalen und frühkindlichen Stresses genauer zu erforschen. Zu diesem Zweck benutzen wir immunhistologische Techniken. In **Kapitel 5** wurde die neurale Aktivität mit Hilfe eines anti-c-Fos Antikörpers untersucht. In dieser Studie wollten wir die Interaktion zwischen 5-HT und frühkindlichen aversiven Erfahrungen weiter erforschen, ins besondere im Hinblick auf Angstverhalten. Wie in der vorherigen Studie, beschrieben in **Kapitel 3**, benutzten wir in dieser Studie *Tph2^{-/-}* und *Tph2^{+/-}* Tiere, sowie wildtypische Wurfgeschwister, die frühkindlicher Deprivation ausgesetzt wurden. Diese Tiere wurden im Erwachsenenalter schließlich einem, von zwei spezifischen, Angsttest unterzogen und die neurale Aktivität, die durch ebenjene Angsttests ausgelöst wurde, wurde untersucht. Effekte maternaler Deprivation wurden nur in *Tph2* defizienten Nachkommen beobachtet. In beiden Angsttests förderte maternale Deprivation eine aktivere Stressbewältigung. Auch hatten beide Angsttests die Aktivierung neuraler Zellen in allen untersuchten Gehirnregionen des Angstsystems zur Folge. In manchen Regionen war diese Aktivierung jedoch spezifisch für entweder den *Tph2* Genotypen oder MS, abhängig vom verwendeten Angsttest. Diese Beobachtung legt eine spezifische Rolle sowie Suszeptibilität bestimmter Gehirnstrukturen nahe.

In **Kapitel 6** war das Ziel die Validierung eines vormals identifizierten Kandidatengens, welches im Zusammenhang einer Gene-Umwelt-Interaktion des 5-HTT mit pränatalem Stress verändert gefunden worden war, nämlich „Myelin basisches Protein“ (*MBP*). In dieser Studie untersuchten wir das DNS-Methylierungsprofil in humanen Kindern sowie in adulten Mäusen im Zusammenhang mit pränatalem Stress. In den Mäusen untersuchten wir zudem die RNA-expression zweier Isoformen des *Mbp* Gens. Die Natur und der Schweregrad des pränatalen Stresses wurden in den Menschen durch spezifische angst- und depressionsbezogene Fragebögen abgefragt. Zusätzlich wurde das Cortisol im Speichel gemessen. Des Weiteren wurde die DNS-Methylierung an einem *Locus* des *MBP* Gens an DNS aus Nabelschnurblut untersucht. In der Maus-Studie, wurden Nachkommen wildtypischer Mütter, die von einem heterozygoten Männchen geschwängert worden und vom Tag 13 bis zum Tag 17 der Schwangerschaft einem Stressparadigma ausgesetzt worden waren, untersucht. Das DNS-Methylierungsprofil, sowie Expression zweier Isoformen und Protein wurden im Hippocampus der adulten Tiere erforscht. Unabhängig von der untersuchten Spezies, konnte eine Suszeptibilität, der DNA methylierung zur pränatalen Umgebung festgestellt werden. Im Menschen war ein erhöhter Cortisol-spiegel während der Schwangerschaft mit erhöhter *MBP* Methylierung an einem der zwei untersuchten CpGs assoziiert. Dies war nur in weiblichen Nachkommen beobachtbar. In der Maus-Studie, war die verringerte Gewichtszunahme, die in gestressten Müttern beobachtet wurde, mit einer erhöhten Methylierung an dem vormals identifizierten Locus in wildtypischen, nicht jedoch in *5-Htt* defizienten Nachkommen, assoziiert.

Kapitel 7 stellt die Diskussion aller, in der Thesis präsentierten, Daten dar. Die Ergebnisse werden kritisch diskutiert und ins Verhältnis gesetzt mit der Arbeit anderer Forscher. Des Weiteren werden limitierende Faktoren, sowie mögliche zukünftige Forschungsrichtungen aufgezeigt. Alles in allem unterstreicht die Arbeit, die in dieser Thesis dargestellt wird, die zentrale Rolle des 5-HT-systems in der Modifikation von frühen Lebenserfahrungen. Auch bilden die Ergebnisse dieser Arbeit die Basis für weitere, zielgerichtetere Forschung, mit einem Fokus auf die in dieser Studie identifizierten Gene und Mechanismen.